

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-121200

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 P 21/00

識別記号

C

庁内整理番号

8214-4B

8717-4B

7236-4B

⑭ 公開 平成4年(1992)4月22日

C 12 N 15/00

5/00

A

C\*

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全26頁)

⑮ 発明の名称 植物細胞におけるポリペプチドの製造法

⑯ 特 願 平2-238234

⑰ 出 願 平2(1990)9月7日

特許法第30条第1項適用 平成2年3月10日、日本植物病理学会発行の「日本植物病理学会大会講演要旨予稿集」に発表

⑱ 発 明 者 森 正 之 京都府京都市左京区田中大堰町77 沢村方  
⑱ 発 明 者 三 瀬 和 之 京都府京都市左京区一乗寺西水干町302 川端ハイツ409号  
⑱ 発 明 者 奥 野 哲 郎 京都府京都市左京区浄土寺上南田町24  
⑱ 発 明 者 古 澤 巖 京都府京都市左京区高野東開町1-23 東大路高野第三住宅36棟303

⑲ 出 願 人 日本農業株式会社 東京都中央区日本橋1丁目2番5号

⑳ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

植物細胞におけるポリペプチドの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 植物ゲノムにBMVのRNA1及び/又は2のcDNA及びBMV RNA外被蛋白質遺伝子の全部又は一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換えた組換えBMV RNA3のcDNAを導入又は接種することによって、所望のポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチドの製造法。

(2) 植物ゲノムにBMVのRNA1及び/又は2のcDNAを導入することによって、1a及び又は2a蛋白質を生産し、該植物細胞に組換えBMV RNA3を接種することによって、ポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチドの製造法。

(3) 上記cDNAが、完全長cDNA しくは3'末端非翻訳領域に欠失を持つcDNAである請求項1又は2記載の製造法。

(4) インビトロ的に機能的なプロモーターとBMVのRNA3 cDNAからなるベクターであって、BMV RNA3外被蛋白質遺伝子の全部または一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換えた組換えBMV RNA3を生産する転写ベクター。

(5) 請求項1又は2記載の製造法に使用するための、植物細胞中で機能的なプロモーター及びターミネーター間に、BMV RNA1、2又は3のcDNAを導入した植物形質転換用ベクター。

(6) 上記cDNAが完全長cDNA若しくは3'末端非翻訳領域に欠失を持つcDNAである請求項5のベクター。

(7) 請求項5又は6記載のベクターで形質転換された植物細胞。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、遺伝子工学的手法により、分節ゲノム型ウィルスプロモモサイクウィルス (bromomosaic virus、以下BMVという) の増

細胞系を利用して植物 細胞において農業及び医薬分野に有用な物質を生産する方法に関する。また、本発明は、これらの方法に用いる植物形質転換用ベクター、組換えRNA転写ベクター及び形質転換植物細胞に関する。

#### 〔従来の技術〕

植物細胞に有用物質例えばポリペプチドを生産させる技術として、T1プラスミド形質転換系を用いて有益遺伝子を植物に組み込み発現させる方法と植物ウイルスの増殖系を利用した物質生産系が開発されつつある。しかしながら、これまで生産効率が低いことが問題点として指摘されている。例えば、タバコモザイクウイルス(TMV)は宿主植物中に最大2g/坪のウイルス粒子を生産するが、TMV外被タンパクの遺伝子部分を目的物質の外来遺伝子に置き換え宿主植物に接種した場合、目的物質の生産効率は約1g/坪にすぎない(Takamatsuら、(1987)EMBO J. 6: 307-311)。効率が低下する原因として、TMVは1本鎖RNAに4種類の遺伝子がオーバ

は解明されており(Ahlquistら、(1984)J. Mol. Biol. 172: 369-383)、RNA1は全長3234塩基で1a蛋白質(分子量109キロダルトン(KD))をコードし、RNA2は全長2865塩基で2a蛋白質(分子量94KD)をコードしており、1a及び2a蛋白質は複製酵素のサブユニットと考えられている。(+)鎖のBMV RNAは植物細胞中で、この複製酵素によって、(+)鎖から(-)鎖が合成され、次に合成された(-)鎖を鋳型として(+)鎖が大量に合成されると考えられている。一方、RNA3は全長2134塩基で3a蛋白質(分子量34KD)及び外被蛋白質(分子量20KD)の二つの遺伝子産物をコードしているが、RNA3から直接翻訳されるのは5'側の3a蛋白質だけである。

RNA4は全長876塩基でRNA3 外被蛋白質遺伝子部分と同一の配列を持ち外被蛋白質のmRNAとなり、RNA4は宿主細胞中でRNA3から合成される(Ahlquistら、(1981)J.

ーラップしてコードされているため外来遺伝子の置き換えによってTMV複製の制御機構が影響を受け ことによると考えられている。

一方、BMVは、プロモウイルス群(bromo virus group)に属し、イネ科に属する多くの植物を宿主とする植物ウイルスである。BMV ゲノムは3種の(+)鎖の一本鎖RNAからなり、分子量の大きいものから順にRNA1、2及び3と呼ばれている。さらに、BMVにはサブゲノムRNAと呼ばれるRNA4も存在する(第1図)。これらのRNAは、直径約28nmの球状粒子中にRNA1及び2はそれぞれ単独で、RNA3と4は共に包装されている(Laneら、(1974)Adv. Virus Res. 19: 151-220)。BMVは感染植物細胞内における増殖量が多く、しかもゲノムが分割されているという特徴から、外被蛋白質遺伝子への外来遺伝子の置き換えによってウイルス複製の制御機構が影響を受けにくいと考えられ、分子生物学的物質生産の材料として研究されてきている。BMV全ゲノムの塩基配列

Hol. Biol. 153: 23-38)。その機構は、RNA3(+)鎖から(-)鎖が合成され、この(-)鎖の内部からRNA4(+)鎖が合成されることよることが明らかになった(Millerら、(1985)Nature 313: 68-70)。Ahlquistらは、RNA3から外被蛋白質遺伝子大部分を取り除き、その部分にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を導入した組換えRNA3をRNA1及び2とともにオオムギプロトプラストに感染させ、高レベルのCATが発現することに成功しているが、このベクター系では植物体での発現には利用できなかった(Ahlquistら、(1986)Science, 231, 1294-1297)。本発明者は、さらに優れた生産方法を提供すべくBMV遺伝子を研究した結果本発明を完成した。

#### 〔発明の解決すべき課題〕

上記のように、植物ウイルスを用いた物質生産において高収率の系はいまだ開発されていない。BMVのベクター化の方法においても、BMV

各ゲノムを植物ゲノムに導入し発現させた例はなく、外被蛋白質遺伝子を外来遺伝子と置換した組換えRNA 3とRNA 1及び2を混合して植物プロトプラストに接種し、プロトプラスト内で外来遺伝子を生産するものであり(第12図その1)、プロトプラストへのRNA感染効率が低いこと並びに組換えウイルスRNAが全身感染できないこともあり、個々の細胞における発現量が少ないという問題点が存在する。さらに、ウイルスRNAをインビトロ的に生産することは、生産効率及びコストという点で産業化における大きな欠点である。従って、BMV RNAをcDNA化し、植物細胞中で発現できるように改造し並びに外被蛋白質遺伝子を外来遺伝子と置換した組換えRNA 3を構築し、それらを例えばT1プラスミド等の植物細胞形質転換に用いられるベクターDNAに組み込み、それらのDNAで植物細胞を形質転換してBMV各ゲノムを発現させる等の遺伝子工学技術を用いることにより、BMV各ゲノム及び外来遺伝子が全ての細胞で大量に発現できるポリペ

の製造法。

(2) 植物ゲノムにBMVのRNA 1及び/又は2のcDNAを導入することによって、1a及び又は2a蛋白質を生産し、該植物細胞に組換えBMV RNA 3を接種することによって、ポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチドの製造法。

(3) 上記cDNAが、完全長cDNA若しくは3'末端非翻訳領域に欠失を持つcDNAである請求項1又は2記載の製造法。

(4) インビトロ的に機能的なプロモーターとBMVのRNA 3 cDNAからなるベクターであって、BMV RNA 3外被蛋白質遺伝子の全部または一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換えた組換えBMV RNA 3を生産する転写ベクター。

(5) 請求項1又は2記載の製造法に使用するための、植物細胞中で機能的なプロモーター及びターミネーター間に、BMV RNA 1、2又は3のcDNAを導入した植物形質転換用ベクター。

プチド製造法の開発が待ち望まれている(第12図その2)。この場合、ウイルスRNAが大量に増殖すると植物に対して病徴を引き起こし植物の生育に悪影響を及ぼすため、外来遺伝子以外のウイルスRNAの増殖は必ずしも必要でないと考えられることから、例えばRNA 1及び2の増殖能を欠如し翻訳能のみを残し、その結果、1a及び2a蛋白質(BMV RNA複製酵素)のみが翻訳されるように、ウイルスゲノムを改造する方法も待ち望まれている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、BMVの植物細胞内の増殖系を利用してポリペプチド等の有用物質を遺伝子工学的に植物において生産する方法に関し、

(1) 植物ゲノムにBMVのRNA 1及び/又は2のcDNA及びBMV RNA外被蛋白質遺伝子の全部又は一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換えた組換えBMV RNA 3のcDNAを導入又は接種することによって、所望のポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチド

(6) 上記cDNAが完全長cDNA若しくは3'末端非翻訳領域に欠失を持つcDNAである請求項5のベクター。

(7) 請求項5又は6記載のベクターで形質転換された植物細胞。  
に關する。

以下、詳述に説明する。

#### (1) BMV

本発明において、利用されるBMVは、米国のATCC(American Type Culture Collection)にATCC株66として寄託されている。

上記BMVのゲノムは、第1図に示したように4種類のRNAに分かれている。

このBMV RNAのうち本発明において、植物ゲノムに導入されるべく改造される部分は、第1図のRNA 1、2及び、又は、3であり、改造されたRNA 3のうち所望ポリペプチドの構造遺伝子によって組換えられるは3'末端側の外被蛋白質遺伝子部分である。

#### (2) 植物形質転換用ベクターの構築

BMV RNA、RNA抽出法として公知の方法たとえばグアニジン法、熱フェノール法、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) フェノール法等を用いウイルス粒子から抽出し、アガロースゲル電気泳動でRNA 1、2及び3を分離精製する。それぞれのBMV RNAの相補性DNA

(cDNA)の構築は、常法の遺伝子操作技術を利用して行なうことができる (Ahlgvistら、(1984)、J. Mol. Biol. 172:369-383 Sambrookら、(1989) Molecular Cloning 2nd Edition, CSH Laboratory Press.)

本発明において、BMV RNA 1及び2のcDNAは、形質転換用ベクターに組換えられ、植物細胞中でRNA 1及び2、あるいは1a及び2a蛋白質が生産される。BMV RNA 3のcDNAは、外被蛋白質部分が所望のポリペプチドの構造遺伝子に置き換えられ、形質転換用ベクターに組換えられ、植物に接種するかあるいは植物ゲノムに導入される。

所望のポリペプチドとしては、本発明の実施例

型ベクターを用いて植物ゲノム内にBMV RNAの完全長cDNAを導入した場合、導入細胞では合成された転写物は野生型ウイルスRNAと同じように増殖し、また翻訳も行なわれる。一方、第二型ベクターを用いて植物ゲノム内にBMV RNAの3'末端欠失cDNAを導入した場合、導入細胞では合成された転写物は増殖しないが翻訳は行なわれ翻訳産物のみが生産される。ウイルスRNAが大量に増殖すると植物に対して病徴を引き起こし植物の生育に悪影響を及ぼすと考えられることから、このような問題点を解決するためには第二型ベクターを使用すれば良い。

BMV RNA 1及び2、又は組換えRNA 3のcDNAは植物細胞内に存在するDNA依存RNAポリメラーゼによって認識されるプロモーター及びターミネーターの間に導入されなければならない。このような植物細胞中で機能的なプロモーター及びターミネーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス (cauliflower mosaic virus、以下CaMV) 35Sプロモーター及びCaMV

に示すGUS遺伝子に限定されず、TMV等の植物ウイルスの外被蛋白質遺伝子、ササゲトリプシンインヒビター遺伝子の他にインターフェロン遺伝子等を挙げることができる。

そのために使用される形質転換用ベクターとしては、第2図に示した第一型 (pBICBRベクター) 及び第二型 (pBICBMRベクター) の2種類のベクターである。2種類のベクターとも完全な1aあるいは2a翻訳領域を保持するが、第一型ベクターは、BMV RNAの5'末端及び3'末端の完全な非翻訳領域を保持する。それに対して、第二型ベクターは、完全な5'末端非翻訳領域を持つが、3'末端非翻訳領域に欠失を持つ。BMV RNAの5'末端非翻訳領域は、翻訳能及び(-)鎖から(+)鎖の合成に必須であり、3'末端非翻訳領域は、(+)鎖から(-)鎖の合成に必須である。そのため、3'末端非翻訳領域の欠失は、(+)鎖から(-)鎖の合成の欠失につながりウイルスRNAの増殖能を失わせることとなるが、翻訳能に影響を及ぼさない。第一

ターミネーター等で代表される植物細胞中で機能的なターミネーター等がある。5'末端に余分な7塩基の塩基配列を持つ変異BMV RNA株は感染能力を持たないこと (Jandaら、(1987) Virology 158:259-268) が明らかになっているため、植物細胞に導入したBMV RNAの完全長cDNAの核内転写物に翻訳能力を持たせるためには、cDNAの転写開始点をBMV RNAの5'末端と正確に一致させる必要がある。CaMVの35Sプロモーターを用いた場合、転写開始点のすぐ下流にBMV RNAの完全長cDNAを導入するために、CaMV 35Sプロモーターの転写開始点に部位特異的突然変異導入法によって平末端を生じさすような制限酵素 認識部位 (StuI等)を導入し、BMV RNAのcDNAを平末端末端化した転写開始点のすぐ下流に導入する。

### (3) 植物形質転換用ベクターによる形質転換体の作製

アグロバクテリウム・ツメファシエンス

(*Agrobacterium tumefaciens*) を用いた植物形質転換法としては、リーフディスク法 (Horschら、(1985) Science 227: 1229-1231) が最も一般に利用される T i プラスミドには *vir* 領域があり、この領域の働きによって、T i プラスミド中の T-DNA 領域を *A. tumefaciens* の宿主細胞ゲノム中に導入できる (Masterら、(1984) Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 387-413)。T i プラスミドを用いた遺伝子導入法としては、現在バイナリーベクター法が広く用いられている。これは、T i プラスミドを T-DNA が欠失し *vir* 領域を持つ T i プラスミドと T-DNA を含むバイナリーベクターに分割して用いるものである。バイナリーベクターとは *A. tumefaciens* でも大腸菌でも増殖できるベクターである。それぞれのプロモーター、BMV cDNA 及びターミネーターで構成される DNA は、バイナリーベクター中の T-DNA 領域に組み込まれ、形質転換用ベクターが構築される。このような形質転換用ベクターを

の植物は、野菜、たとえばニンジン、レスタ、ジャガイモ、等；他の収獲物、たとえばタバコ、ナタネ、ダイズ、ペニバナ、等を含む。単子葉植物に使用する場合には、*A. tumefaciens* を用いた手法は利用できないが、プロトプラストへのエレクトロポレーション (electroporation) 法、リボゾーム融合、マイクロインジェクション、植物組織へのパーティクルガン (particle gun) を用い導入可能であり、対象の植物は、穀類、たとえば小麦、大麦、トウモロコシ、イネである。

第一型又は第二型ベクターを用いて BMV RNA 1 及び 2 の cDNA を導入して形質転換細胞中では生物活性を持つ 1 a 及び 2 a 蛋白質が全ての細胞で発現される。つまり、このような形質転換細胞中では、多粒子型ウイルスの分節ゲノムをウイルス 創製機構から致立させ、植物の転写及び翻訳機構に依存して発現させることができる。(第 12 図そ 2)。又、まず RNA 1 及び 2 の cDNA を導入した形質転換細胞中に形質転換用ベクターを用いて組換え RNA 3 又は RNA 3 の

T-DNA が欠失し *vir* 領域を持つ T i プラスミドを保持する *A. tumefaciens* 細胞中に導入し、該 *A. tumefaciens* を宿主植物に接種すれば、*vir* 領域の働きによって、該組み合わせの構成からなる DNA を含む T-DNA 領域を宿主ゲノム中に導入しうる。その他の公知の遺伝子導入法、すなわちプロトプラストへのエレクトロポレーション (electroporation) 法、リボゾーム融合、マイクロインジェクション、植物組織へのパーティクルガン (particle gun) あるいはそれらに準じた方法等によっても、該組み合わせの構成からなる DNA を植物細胞に導入できる。

形質転換体の選抜には、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスホトリシン等の薬剤を用いることが出来る。形質転換体は、適宜の培地で培養してカルス形成、カルス増殖、さらに必要に応じて不定胚分化または器官分化を行ない、ついで植物ホルモンを添加した植物体再分化用培地で植物体に再生させることができる。

双子葉植物に本発明を使用する場合には、対象

cDNA を導入するか、もしくは組換え RNA 3 又は RNA 3 を接種すれば、既に形質転換細胞中で生産されている 1 a 及び 2 a 蛋白質の働きにより、組換え RNA 3 又は RNA 3 から組換え RNA 4 又は RNA 4 が転写され、組換え RNA 4 又は RNA 4 から植物の翻訳機構を利用して大量の所望の生産すべきポリペプチド又は外膜蛋白質を生産することもできる。

#### (4) 組換え BMV RNA 3 転写ベクターの構築

本発明において、所望の生産すべきポリペプチドをコードする DNA は、インビトロ的に転写産物を生産するための転写ベクターに組換えられた後、該組換え転写ベクターにより、RNA として生産しても良い。

BMV RNA をインビトロ的に合成するには、DNA 依存 RNA ポリメラーゼが不可欠である。DNA 依 RNA ポリメラーゼには T7 RNA ポリメラーゼ、SP6 RNA ポリメラーゼ及び大腸菌 RNA ポリメラーゼ等が市販されている。本発

明では、プロモーター領域の塩基配列並びに転写開始点が正確に明らかになっており並びに高転写活性を有するT7 RNAポリメラーゼ (Dunnら、(1983) J. Mol. Biol. 166: 477-535) を用いたインビトロBMV RNA合成系を利用した。ウイルスRNAの5'末端の複製の構造は、ウイルスRNAの複製や翻訳等において非常に重要な機能を持っており、5'末端に余分な塩基配列が付加されるとウイルスRNAの生物活性は激減することが報告されている (Jandaら、(1987) Virology 158: 259-262)。そのため、野生型と同一の5'末端の塩基配列を持つウイルスRNAをインビトロ的に合成するには、cDNAの5'末端から正確に転写が開始されねばならない。従って、転写開始点を平滑末端化し、BMV RNAの完全長cDNAを導入するために、T7プロモーターの転写開始点に平滑末端を生じさせる制限酵素認識部位を導入すれば良い。例えば、2種の31塩基からなる合成オリゴヌクレオチドd (CTAGATGCATATAGTGAGTCGTATTA

される。pBTF3ベクターは、第4図の制限酵素地図により特徴づけられるものである。すなわちpBTF3ベクターは、T7プロモーターとBMV RNA3 cDNA及び大腸菌のベクターであるpUCベクターの遺伝子とを含むベクターである。上記ベクターの外核蛋白質遺伝子部分内にあるStuI制限酵素切断部位にリンカー等を接合させることによってSacI制限酵素切断部位に置き換え、SacI/SacI断片 (No 1478-1782) を取り除きセルフライゲーションによってpBTF3 (Sac) ベクターを構築する。

pBTF3 (Sac) への外来DNA断片の導入は、ATG翻訳開始コドンを含む外来DNA断片を上記ベクターのHincII-SacI部位に導入する。pBTF3 (Sac) ベクターHincII-SacI部位に外来DNAを導入するには、翻訳開始コドン側にHincIIと接合できる平滑末端を持ちターミネーター側にSacI制限酵素切断部位を持つ外来DNA断片

ATTTA) 及びd (AGCTTAATTAATACGACTCACTATATGCAT) の5'及び3'末端をリン酸化した後アニーリングして、T7プロモーターのコンセンサス配列 他に5'末端にHindIII部位、3'末端にXbaI部位を突出して持ち、さらに、転写開始点から(+4)の位置にNsiI部位を持つT7プロモーターを合成し、このような合成T7プロモーターをpUC19のHindIII/XbaI部位に導入し転写ベクターpUCT (第3図) を構築する。pUCTにNsiI切断およびT4 DNAポリメラーゼ処理を行ない、T7プロモーターの(+1)位までの塩基を除去し(-1)位の塩基対で平滑末端を形成させ、BMV RNA cDNAを含むSnaBI/EcoRIと、NsiI切断及びT4 DNAポリメラーゼ処理後EcoRI切断を行なったpUCTの大断片をライゲーションし、BMV RNA3の転写ベクターpBTF3が構築される (第3図)。

組換えBMV RNA3転写ベクターを構築するための材料としてはpBTF3ベクターが利用

を接続すればよい。すなわち、上記のように両端を修飾した外来DNA断片は、pBTF3 (Sac) ベクターをHincII、SacIで切断したものと接続すればよい。

転写産物の生産にあたっては、組換えpBTF3ベクターをEcoRIで切断することによってリニアなDNAの形状にして鋳型として用い、ATP、UTP、CTP、GTP、キャップアナログ ( $m^7GpppG$ )、T7 RNAポリメラーゼを含むインビトロ転写システムによって組換えRNAを大量生産する。

#### (5) 1a及び2a蛋白質を生産する形質転換体プロトプラストにおけるポリペプチドの生産

植物形質転換用ベクターで形質転換された植物細胞中で生産されている1a及び2a蛋白質の働きにより、組換えRNA3からRNA4が転写され、導入されたDNA断片にコードされたポリペプチドが植物の翻訳系によって生産される。又、植物形質転換用ベクターで形質転換された植物から調製されたプロトプラストに、インビトロに生

産された組換えBMV RNA 3を接種すること  
もできる。接種の方法としては、ポリカチオン法、  
ポリエチレングリコール法、エレクトロポレー  
ション法等の公知の方法が用いられる。

このような形質転換細胞中に組換えRNA 3を  
接種すれば、既に形質転換細胞中で生産されてい  
る1a及び2a蛋白質の働きにより、組換え  
RNA 3から組換えRNA 4が転写され、導入さ  
れたDNA断片にコードされたポリペプチドが植  
物の翻訳系によって生産される。ポリペプチドの  
生産は、例えばβ-グルクロニダーゼ遺伝子を導  
入した場合、感染細胞内に大量のβ-グルクロニ  
ダーゼが生産されていることが、一般的に使われ  
る染色法等を用いることによって確認することが  
できる。〔発明の効果〕

本発明の方法は、BMVの分節ゲノムにコード  
されたウイルスRNA複製酵素を植物体内に組み  
込み発現させ、所望の遺伝子を植物体内で大量に  
複製し、ポリペプチドの効率的な生産を可能とし、  
産業上の価値は極めて、大きいものである。本発

明の方法では、外来DNAはBMV RNA 3の  
外被蛋白質遺伝子と組換えられてから植物形質転  
換用ベクターに導入され植物ゲノムに組み込まれ  
植物細胞内で組換えRNAとして転写させるか、  
又は、組換え転写ベクターに導入されインビトロ  
的に合成されたRNAとして植物に接種されるた  
め、従来のインビトロ的にすべてのBMV RNA  
Aを合成して植物に接種するよりも、極めて効率  
的な利用法になる。組換えRNA 3に導入される  
遺伝子としては、種々のものが考えられる。たと  
えば、TMVあるいはCMV等の植物ウイルスの  
外被蛋白質遺伝子であればウイルス抵抗性植物の  
育種につながり、ササゲトリプシンインヒビター  
遺伝子であればスペクトラムの広い害虫抵抗性植  
物の育種につながる。また、農業上有用な蛋白質、  
機能性蛋白質、医薬となる蛋白質例えばインター  
フェロン等、の遺伝子が導入可能である。さらに、  
内在性RNAに相補的なアンチセンスRNAを組み  
込み、植物細胞中でアンチセンスRNAを大量に  
複製すれば、内在性RNAの翻訳を抑制すること

ができ、植物遺伝子の発現を調節することが可能  
である。

#### 〔実施例〕

以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に  
説明するが本発明はこれらに限定されるべきもの  
ではない。

実施例1. BMV RNA転写ベクター及び植物  
形質転換用ベクターの構築

A. BMV RNA 1, 2及び3のcDNAの作製

BMVは、ATCCBB系統を用いた。ウイル  
ス増殖にはオオムギ (*Hordeum vulgare* L. 品種：  
五穀四石)を用い、公知の分離遠心分離法  
(Okunoら、(1978) J. Gen. Viol. 38:  
409-418)によってウイルス粒子を純化し、  
純化BMVを用いてベントナイト及びSDS存在  
下でフェノール抽出を3-4回繰り返して、エチル  
エーテル処理、エタノール沈澱を行ないRNAを  
得た。

得られたRNAの溶液から、標準的な低融点ア  
ガロース電気泳動を用いた分離法 (Sambrookら、

(1989) Molecular Cloning 2nd, CSH  
Laboratory Press) により、RNA 1, 2及び3  
をそれぞれ得た。得られた各RNAから、公知の  
方法 (Ahlgvistら、(1984)、J. Mol.  
Biol. 172: 389-383) によってRNA  
1, 2および3の完全長cDNAを調製しpUC  
ベクターにクローニングしたものがそれぞれ  
pBB1, 2および3である。pBB1, 2およ  
び3は、完全長cDNAのBMV RNA 5' 末  
端に相当する部位にSnaBI部位を持ち3' 末  
端のすぐ下流にEcoRI部位を持っている。  
B. BMV RNA転写ベクターの構築と感染性  
RNAのインビトロ合成  
B-1 BMV RNA転写ベクター (pBTF1,  
2及び3) の構築

BMV RNAをインビトロ的に合成するには、  
DNA依存RNAポリメラーゼ不可欠である。  
DNA依存RNAポリメラーゼにはT7 RNAポ  
リメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ及び大腸  
菌RNAポリメラーゼ等が市販されているが、本

実験では、プロモーター領域の塩基配列並びに転写開始点が正確に明らかになっており並びに高転写活性を有するT7 RNAポリメラーゼ (Dunnら、(1963) J. Mol. Biol. 166: 477-535) を用いたインビトロBMV RNA合成系を使用した。

ウイルスRNAの5'末端の核糖の構造は、ウイルスRNAの複製や翻訳等において非常に重要な機能を持っており、5'末端に余分な塩基配列が付加されるとウイルスRNAの生物活性は激減することが報告されている (Jandaら、(1987) Virology 158: 259-262)。そのため、野生型と同一の5'末端の塩基配列を持つウイルスRNAをインビトロ的に合成するには、cDNAの5'末端から正確に転写が開始されねばならない。従って、転写開始点を平滑末端化し、BMV RNAの完全長cDNAを導入するために、T7プロモーターの転写開始点に制限酵素認識部位を導入することを試みた。

#### B-1-1 T7プロモーターの合成

ヌクレオチド溶液をエバポレーターによって減圧乾固し、イオン交換水に溶解し、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のオリゴヌクレオチド溶液を調製した。

これらの合成オリゴヌクレオチドの5'及び3'末端をリン酸化した。すなわち、 $1\mu\text{l}$ のオリゴヌクレオチド ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )、 $20\mu\text{l}$ の $10\text{mM}$  ATP、 $20\mu\text{l}$ の $10\times$ キナーゼ溶液 ( $500\text{mM}$  トリス-HCl、 $\text{pH}7.5$ 、 $100\text{mM}$  MgCl<sub>2</sub>、 $100\text{mM}$  クチオスレイトール (DTT))、 $4\mu\text{l}$ のT4ポリヌクレオチドキナーゼ ( $4\text{unit}/\mu\text{l}$ 、宝酒造社製) 及び $155\mu\text{l}$ のイオン交換水を含む反応液を $37^\circ\text{C}$ 、1時間反応させ、オリゴヌクレオチドのリン酸化を行った。反応後、 $65^\circ\text{C}$ 、10分間の熱処理によって酵素の不活性化を行った。反応液にフェノール処理2回、フェノール/クロロホルム処理1回、クロロホルム処理1回及びエチルエーテル処理3回を行ない、その後減圧下に30-40分間置き、反応液中に混在するエチルエーテルを完全に除去した。

DNA合成装置 (Applied Biosystems社モデル381A) を用いて、2種の31塩基からなるオリゴヌクレオチド (CTAGATGCATATAGTGAGTCGTATTAATTA) 及び (AGCTTAAATTAATACGACTCACTATATGCAT) を合成した。合成終了後、常法に従って高速液体クロマトグラフィーによって精製し、回収したオリゴヌクレオチド溶液に $1/200$ 容量の $2\text{N}$  HClを加え中和した後、NENSORB 20 (Du Pont社製) に添加して脱塩を行なった。まず、2 $\mu\text{l}$ のメタノール (高速液体クロマトグラフィー用、ナカライデスク社製)、2 $\mu\text{l}$ のA液 ( $0.1\text{M}$  トリス-HCl、 $10\text{mM}$  Triethylamine (TEA)、 $1\text{mM}$  Na<sub>2</sub>-EDTA)、 $\text{pH}7.7$ ) によってカラムの平衡化を行なった。次にサンプルに $1.4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の割合でTEAを加えたものをカラムに添加し吸着させた。6-9 $\mu\text{l}$ のA液及び3 $\mu\text{l}$ のイオン交換水でカラムを洗浄した後、 $400\mu\text{l}$ の50%エタノール (特級、ナカライデスク社製) により、オリゴヌクレオチドを溶出した。溶出したオリゴ

この反応液をNENSORB 20カラムに添加し、上述と同様の方法によってリン酸化オリゴヌクレオチドの精製を行なった後、減圧乾固し $50\text{ng}/\mu\text{l}$ となるように蒸留水に溶解し、以後の操作に供試した。

これらの合成オリゴヌクレオチドをアニーリングしてT7プロモーターを合成した。このプロモーター配列はT7プロモーターのコンセンサス配列の他に5'末端にHind III部位、3'末端にXba I部位を突出して持ち、さらに、転写開始点から(+4)の位置にNsi I部位を持つ。

#### B-1-2 転写ベクターpUCTへのBMV RNAの完全長cDNAの導入 (第3図)

合成T7プロモーターをpUC19のHind III/Xba I部位に導入し転写ベクターpUCT (第3図) を精製した。pUCTにNsi IおよびT4 DNAポリメラーゼ処理を行ない、T7プロモーターの(+1)位まで塩基を除去し(-1)位塩基対で平滑末端を形成させることができる。pBB1、pBB2、pBB3それぞれ



れのBMV RNA完全長cDNAを含む  
SnaBI/EcoRI断片と、NsiI切断及びT4DNAポリメラーゼ処理後EcoRI切断を行なったpUCTの大断片をライゲーションし、BMV RNA 1、2および3の転写ベクターpBTF1、2及び3をそれぞれ構築した。

#### B-2 感染性RNAのインビトロ合成

T7プロモーターの転写開始点のすぐ下流にRNA 1、2及び3のそれぞれの完全長cDNAが導入され、さらに、完全長cDNAのすぐ下流にEcoRI部位が存在する転写ベクターpBTF1、2及び3のそれぞれのDNAを塩化セシウム遠心分離法(Sambrookら、(1989) Molecular Cloning 2nd, CSH Laboratory press)によって精製した。それぞれの精製DNA 3μgをEcoRIで切断後、フェノール/クロロホルム処理を行ない、20μgのtRNAをキャリアとして用いエタノール沈殿した。得られた沈殿に16.8μlの蒸留水、10μlの5X転写緩衝液(200mMトリス-HCl(pH7.5)、30

mM MgCl<sub>2</sub>、10mM Spermidine、50mM NaCl)、5μlの100mM DTT、1.8μlのDNase/RNaseフリー牛血清アルブミン(2.8mg/ml)、2.5μlのRNasin(40unit/ml)、2.5μlの10mM ATP、2.5μlの10mM UTP、2.5μlの10mM CTP、0.4μlの10mM GTPおよび5μlの5mMキャプアナログ(m<sup>7</sup>GpppG)を加え、軽く混ざった後、1μlのT7RNAポリメラーゼを加え、37℃で反応させた。1時間後、さらに2μlの10mM GTPおよび1μlのT7RNAポリメラーゼを加え、37℃、1時間反応させた。その後、1.3μlのDNase(1unit/ml)を加え、37℃、1時間反応させ、線型DNAを分解した。この反応液をフェノール/クロロホルム及びクロロホルムでそれぞれ1回ずつ処理し、20μgのtRNAをキャリアとしてエタノール沈殿した後、10μlの蒸留水に懸濁した。

上述の方法でインビトロ合成したBMV

RNA 1、2および3 cDNAのそれぞれの転写物を混合し、それに等量のZX接種緩衝液(100mMトリス-リン酸(pH8.0)、500mM NaCl、10mM EDTA、1%(W/V)ベントナイト)を加え接種液とした。全身感染宿主であるオオムギ葉の上に軽くカーボランダム(600メッシュ)を振りかけ、5-10μlの接種液滴を塗布接種した。接種後、すぐに葉上のカーボランダムを水道水で洗い流した。約2週間、25℃のグロースチャンバー(8,000lux)で育成したところ、全身感染病徴を発現したため、転写ベクターpBTF1、2及び3の転写物は感染性のあることが確認された。

#### C.植物形質転換用ベクターの構築

##### C-1 CaMV 35Sプロモーターの転写開始点への制限酵素認識部位の導入

植物細胞内に存在するDNA依存RNAポリメラーゼによって認識されるプロモーター及びターミネーターの間にBMV RNAの完全長cDNAを導入することを試みた。プロモーター

としては、転写量が多く、転写開始点及びプロモーター領域の塩基配列が明らかにされていることを考慮して、CaMVの35Sプロモーターを用いた。また、5'末端に余分な7塩基の塩基配列を持つ変異BMV RNA株は感染能力を持たないこと(Jandaら、(1987) Virology 158: 259-282)が明らかになっているため、植物細胞に導入したBMV RNAの完全長cDNAの核内転写物に増殖能力を持たせるためには、cDNAの転写開始点をBMV RNAの5'末端と正確に一致させる必要がある。そこで、転写開始点のすぐ下流にBMV RNAの完全長cDNAを導入するために、CaMVの35Sプロモーターの転写開始点に部位特異的突然変異導入法によって制限酵素認識部位を導入した。

##### C-2 部位特異的突然変異導入法(第5図)

京都大学農学部植物病理学研究室保存のCaMV CM1841株の35Sプロモーター領域(7016-7434)をpUC18由来のポリリンカー配列及びCaMV CM1841株

の35Sターミネーター領域(7436-7606)の直前に持つpCAM35を用いた。35Sプロモーター領域の一本鎖DNAを調製するために、pCAM35のPstI/EcoRI断片をpUC118のPstI/EcoRI部位に導入し、pCAM35EPを構築した。pCAM35EPで大腸菌MV1184株を形質転換し、ヘルパーファージュM13K07を利用して一本鎖DNAを調製した。

転写開始点にStuI部位を導入するために、調製した一本鎖DNAの転写開始点に3個所のミスマッチを除いては相補的な25塩基のオリゴヌクレオチドd(6TAGGCCTCTCCAAATGAAATGAAC)をB-1-1に述べた方法で合成及び調製した。1μlの一本鎖DNA(20μg/μl)、1μlの合成オリゴヌクレオチド(2μg/μl)、20μlの10Xアニーリング緩衝液(200mMトリス-HCl(pH7.5)、100mM MgCl<sub>2</sub>、500mM NaCl、10mM DTT)、178μlの蒸留水を1.5μl用エッ

アノール)及び432μlのホルムアルデヒドを混合し、95℃、5分間の熱処理後、水中で急冷した。このサンプルを3.5%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル(15cm×15cm、厚さ2mm、スロット幅1cm)にロードし、200V、2時間電気泳動し、プライマーによって合成された一本鎖DNAを分離した。エチジウムブロミド(0.5μg/μl)でゲルを染色した後、約30μlのイオン交換水で3回洗浄し、余分なエチジウムブロミドと尿素的除去を行った。UV照射下で目的とするバンドを切出し、1μlのシリング(テルモ)を通してゲルを薄片化した。薄片化したゲルを7μlの溶出緩衝液(500mM酢酸アンモニウム、10mM酢酸マグネシウム、1mMEDTA、0.1%SDS)に入れ、37℃で一晩放置した。5000Xg、3分間遠心分離した後、上澄にフェノール処理2回、フェノール/クロロホルム処理1回、クロロホルム処理1回およびエチルエーテル処理3回を行なった。この液を2-ブタノールで4倍に濃縮した後、2倍量

ベンチューブに入れ、62℃、15分間処理を行なった後、7分間室温で検出し、一本鎖DNAに合成オリゴヌクレオチドをアニールさせた。検出後、40μlのKlenow緩衝液(100mMトリス-HCl(pH7.5)、50mM MgCl<sub>2</sub>、50mM DTT)、20μlのdNTP溶液(dATP、dCTP、dGTP、dTTPそれぞれ2mM)、10μlのKlenow fragment(4unit/μl)及び130μlの蒸留水を加え、22℃、5時間の酵素反応を行ない、合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして相補的なDNA鎖を合成した。反応後、フェノール処理及びフェノール/クロロホルム処理、エチルエーテル処理後、エタノール沈澱を行ない、二本鎖DNAの沈澱を得た。この二本鎖DNAをPvuIIにより切断した後、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱を行ない、得られた沈澱に1.5μlのローディング緩衝液(0.89Mトリス-ホウ酸、2mMEDTA、0.2%(W/V))ブロムフェノールブルー、0.2%(W/V)キシレンシ

のエタノール及び10μlのtRNA(2μg/μl)を加え、エタノール沈澱によって一本鎖DNAの沈澱を得、30μlの蒸留水に溶解した。5μlの回収した一本鎖DNA(0.2μg/μl)、1.5μlのM13リバースプライマー(50ng/μl、M13プライマーRV、宝酒造(株))、1μlのアニーリング緩衝液(100mMトリス-HCl(pH7.5)、100mM MgCl<sub>2</sub>、500mM NaCl)、1.5μlのTE緩衝液(10mMトリス-HCl(pH8.0)、1mMEDTA)及び1μlのKlenow fragment(4unit/μl)を混合して二本鎖DNA断片を合成し、転写開始点にStuI部位を導入した。合成した35Sプロモーター領域断片をEcoRIで切断したものをpUC18のEcoRI/SmaI部位に導入し、改変した35Sプロモーター領域を含むpCaP35を構築した。pCaP35をStuIで切断することによって転写開始点を平滑末端にすることができ、BMV RNAの完全長cDNAを転写開始点の

すぐ下流に導入することができる。

### C-3 植物形質転換用ベクター (pBICBRシリーズ) の構築 (第6図)

植物ゲノム内にBMV RNAの完全長cDNAを導入し、導入細胞で合成された転写産物が野生型ウイルスRNAのような翻訳及び増殖能を持つ形質転換植物作出のためのベクターを構築した。

植物形質転換用のアグロバクテリウム・バイナリーベクターpBIN19 (Bevanら、(1984) Nucl. Acids Res. 12: 8711-8721) のEcoRI/HindⅢ部位にCaMVの35Sプロモーター、pUC18由来のポリリンカー部位およびCaMVターミネーターを導入したプラスミドがpBIC35である。pBIC35をEcoRIで切断後T4DNAポリメラーゼ処理によって平滑末端化し、SalIリンカーを付加し、その後SalIで切断しセルフライゲーションを行ない、35Sプロモーターを欠失したpBICT(-E)を構築した。次に、SmaI

で切断したpBICT(-E)にさらに

EcoRIリンカーを付加した後にセルフライゲーションを行ない、SmaI部位をEcoRI部位に改変したpBICTEを構築した。一方、CaMVの35Sプロモーターの転写開始点に部位特異的突然変異導入法によってStuI部位を導入した改変型35Sプロモーターを含むpCa $\beta$ 35をEcoRI切断後、T4DNAポリメラーゼ処理によって両端を平滑末端化し、その両端にSalIリンカーを付加し、SalIおよびBamHIによって切断することによって、改変35Sプロモーターを含むDNA断片をた。この断片をpBICTEのSalI/BamHI部位に導入しpBICP35を構築した。

次に、BMV RNA 1、2および3の完全長cDNA断片を含むpBB1、pBB2およびpBB3のSnaBI/EcoRI断片をそれぞれpBICP35のStuI/EcoRI部位に導入し、植物形質転換用ベクターpBICBR1、2及び3をそれぞれ構築した (第6図)。

### C-4 植物形質転換用ベクター (pBICBMRシリーズ) の構築 (第7図その1~3)

植物ゲノム内にBMV RNAの3'末端欠失cDNAを導入し、導入細胞で合成された転写産物が翻訳能は持つが野生型ウイルスRNAのような増殖能は持たない形質転換体作出のためのベクターを構築した。

BMV RNA 1の完全長cDNAを含むpBB1をXhoI切断後T4DNAポリメラーゼ処理を行ない、両端を平滑末端化した後EcoRIリンカーを付加し、さらにEcoRI切断した後セルフライゲーションを行なった。その結果、RNA 1 cDNAの3'末端非翻訳領域のXhoIから下流の約200塩基の欠失を持つpBB1(-3)を得た。pBB1(-3) RNA 1 cDNAを含むSnaBI/EcoRI断片をpBICP35 StuI/EcoRI部位に導入し、植物形質転換用ベクターpBICBMR1を構築した (第7図その1)。

BMV RNA 2の完全長cDNAを含む

pBB2をPstIおよびHindⅢ切断後、cDNA断片をpUC18のPstI/HindⅢ部位に導入し、RNA 2の3'末端の非翻訳領域を欠失したcDNAを含むpBB2(-H)を得た。pBB2(-H)をHindⅢ切断後T4DNAポリメラーゼ処理を行ない、両端を平滑末端化した後EcoRIリンカーを付加し、さらにEcoRI切断した後セルフライゲーションを行なった。

その結果、RNA 2の3'末端の非翻訳領域HindⅢから下流の約200塩基の欠失を持つpBB2(-3)を得た。pBB2(-3)のRNA 2 cDNAを含むSnaBI/EcoRI断片をpBICP35のStuI/EcoRI部位に導入し、植物形質転換用ベクターpBICBMR2を構築した (第7図その2)。

BMV RNA 3の完全長cDNAを含むpBB3をPstIおよびHindⅢ切断後、cDNA断片をpUC18 PstI/HindⅢ部位に導入し、RNA 3 3'末端の非翻訳領域

域を欠失したcDNAを含むpBB3(-H)を得た。pBB3(-H)をHindⅢ切断後T4 DNAポリメラーゼ処理を行ない、両端を平末端化した後EcoRIリンカーを付加し、さらにEcoRI切断した後セルフライゲーションを行った。

その結果、RNA3の3'末端の非翻訳領域のHindⅢから下流約200塩基の欠失を持つpBB3(-3)を得た。pBB3(-3)のRNA3 cDNAを含むSnaBI/EcoRI断片をpBICP35のStuI/EcoRI部位に導入し、植物形質転換用ベクター

pBICBMR3を構築した(第7図その3)。実施例2. 形質転換植物細胞内における導入されたBMV各ゲノムの発現

A. A. tumefaciensへの植物形質転換用ベクターの導入

1枚のNB寒天培地(0.8% Nutrient Broth、1.5% Bacto Agar)上に大腸菌DH5α株(pBICBRもしくはpBICBMRベクター

きに1秒間の量はんを行ないながら、室温に20分間放置し、種子殺菌を行なった。殺菌後、殺菌水で3-4回種子を洗浄し、LS1培地(第2表)を入れたプラスチックシャーレ(西部(株)、径90mm、深さ20mm)に播種し、26℃、8,000 luxで育成した。約1cmに生長した幼植物をLS8培地(第2表)の入ったバイオポット(日本医科器械(株))に移植し、体長約10cmに生長したものをA. tumefaciens接種に用いた。

形質転換用ベクターを保持する

A. tumefaciensを50μg/滅のカナマイシン含有AB液体培地で30℃、2日間培養とう培養(120回転/分)した。これ以後の操作はすべて無菌的に行なった。無菌培養したタバコの葉を1cm×1cmに切り抜き、上述のA. tumefaciens培養液に1分間浸漬した。あらかじめ殺菌しておいたペーパタオルの上にこの葉片を置き、過剰の細胞液を除き、LS1培地(第2表)上に葉片裏面を上にして置いた。26℃、48時間から72時間培養後、A. tumefaciensを完全に除去

を保持する)、大腸菌HB101株(ヘルパープラスミドpRK2013を保持する)及びA. tumefaciens LBA4404株(T-DNA領域を欠失したT1プラスミドを保持する)をそれぞれ接種し、30℃、2日間培養した。培養後、殺菌した白金耳で3種の細菌を混合し、さらに30℃、2日間培養した。50μg/滅のカナマイシンを含有するAB寒天培地(第1表)上に混合培養した細菌を画線し、30℃、2日間培養し、シングルコロニーを得た。このコロニーが形質転換用ベクターを保持するA. tumefaciens LBA4404株である。

B タバコへのA. tumefaciensの接種及び形質転換体の選抜

接種用タバコ(Nicotiana tabacum cv. Petit Habana SR1)としては、殺菌処理した種子由来の無菌植物を供試した。1.5滅用エッペンチューブに約100μlのタバコ種子を入れ、1滅の70%エタノールでタバコ種子を洗浄した。次に、1.5滅の20%アンチホルミンを加え4分間お

するために、500μg/滅のカルベニシリンを含有するLS1液体培地に移し、26℃、700 luxで2日間培養した。培養後あらかじめ殺菌しておいたペーパタオルの上にこの葉片を置き、LS1液体培地を除き、150μg/滅のカナマイシン及び100μg/滅のカルベニシリンを含有するLS4培地(第2表)に移し、26℃、8,000 luxで約2-3週間培養した。発芽した5-10mmのシュートを殺菌したメスでカルスから切り取り、100μg/滅のカナマイシン及び150μg/滅のカルベニシリン含有MSR培地(525μg/滅のナフタレン酢酸と100μg/滅の6-ベンジルアデニンを含み、寒天代わりにGelatinを用いたLSプレート培地)に移した。2週間後、全身約5cmに育成した幼植物を直径12cm植木鉢に鉢上げし、透明なプラスチックボックスで植物を覆い、数日間馴化させた後、グースチャンパー内で育成した。

形質転換用ベクターpBICBR1、pBICBR2およびpBICBR3によるカナマ

インシン耐性形質転換タバコをそれぞれBR1、BR2およびBR3、また、形質転換用ベクターpB1CBMR1、pB1CBMR2およびpB1CBMR3によるカナマイシン耐性形質転換タバコをそれぞれBMR1、BMR2およびBMR3と名付けた。

#### C. タバコに導入したBMV各遺伝子産物の発現分析

カナマイシン耐性を示した形質転換植物の中で導入されたBMVの各遺伝子が発現しているかどうかを調べる方法として、導入された1a遺伝子の発現の分析は、形質転換タバコから調製したプロトプラストにRNA2および3の混合物を接種することによって、また、2a遺伝子の発現の分析はRNA1および3の混合物を接種することによって行なった。RNA1、2および3は、実施例1Bの項で述べた方法によってpBTF1、2および3からインビトロ的に合成した。

ウイルスRNA複製酵素である1a及び2a蛋白質が発現している細胞中では、接種したRNA

5、6-5、8に調製したもの）に浸し、15分毎にコルベンを軽く振り混ぜ、26℃で2時間培養した。得られたプロトプラスト懸濁液に含まれる未分原組織を、4-6割のガーゼで濾別し、50cc用ガラス遠沈管に移し、100Xg、2分間の遠心分離によってプロトプラストを集め、さらに、0.5Mのマニトール液による遠心洗浄を2回繰り返した。

#### C-2 タバコプロトプラストへのBMV RNAの接種

0.5Mマニトールに懸濁したプロトプラストを4-6本の10cc容ポリプロピレン製培養チューブ（日本製薬#06480）に移し、100Xg、2分間の遠心分離でプロトプラストを集め、上清を除去した。プロトプラストに2-10μgのBMV RNAと10μgのtRNAを含むT液（0.5Mマニトール、40mM CaCl<sub>2</sub>）を0.7cc加えよく混和した後、直ちにPEG溶液（40%PEG4000、0.5Mマニトール、40mM HCl）を0.7cc加え、上下逆

3から外被蛋白質のmRNAであるRNA4が転写され、細胞内にBMVの外被蛋白質が蓄積するものと考えられる。外被蛋白質はRNA3から直接翻訳されることはなく、BMVの複製酵素によって（-）鎖RNA3から転写されたRNA4をとおりて翻訳されると考えられており

（Millerら、（1985）Nature 313:66-70）、外被蛋白質の発現を検出することによって、間接的に複製酵素あるいは両酵素のサブユニットである1a及び2a蛋白質の発現検出を行なうことができる。そこで、抗BMV抗体を用いたウエスタンブロット法によって外被蛋白質発現の分析を行なった。

#### C-1 プロトプラストの調製

プロトプラストの調製には、葉長15-20cmのタバコ第4-5葉を用いた。切り取ったタバコ葉の裏表皮を剥離し、100ccコルベンに入れた1%セルラーゼオノスカR-10（近畿ヤクルト）、0.05%マセロザイム（近畿ヤクルト）を含む0.5Mマニトール液（KOHでpH

さまにしてゆるやかに混ぜ、氷上で30分間低速振とうした。その後、約8ccのT液を加え上下逆さまにしてゆるやかに混ぜ、氷上に30分間静置した。100Xg、2分間の遠心分離でプロトプラストを集めた後、PEGや未吸着のRNAを除去するためHigh-pH High-Ca<sup>2+</sup>緩衝液（0.7Mマニトール、50mM CaCl<sub>2</sub>、50mMグリシン、pH8.5）による遠心洗浄を3回繰り返した。プロトプラストを3ccの0.71g/lit（0.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM KNO<sub>3</sub>、1mM MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、10mM CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.1μM KI、0.01μM CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、0.7Mマニトール、2500unit/μlマイコスタチン、200μg/μlクロラムフェニコール、pH6.5）に懸濁し、28℃、48時間培養した。

#### C-3 抗体調製とウエスタンブロット分析

抗BMV血清を硫酸アンモニウム法によって調製し、アークロブリン画分を得た。タバコプロトプラストからアセトンパウダーを調製し、これに

上述の精製抗BMV抗体と反応させ、非特異的に植物成分と結合する抗体を除去した。BMV RNAを接種したプロトプラストから抽出した蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、分離された蛋白質をTowbinの方法 (Towbinら、(1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354) によって電気的にメンブレン (Immobilon-P、ミリポア社製) に転写した。転写後、一次抗体に精製抗BMV抗体を1/400に希釈したもの、二次抗体にアルカリホスファターゼでラベルした抗ウサギIgG-ヤギIgGを用い、NBT-BCIPを基質とした発色反応によってBMV外被蛋白質の検出を行なった。

#### C-4 BR 1および2植物細胞における導入した遺伝子産物の分析

BR 1植物から調製したプロトプラストにインビトロで合成したRNA 2+3、また、ポジティブコントロールとしてRNA 1+2+3を接種した。接種48時間後に、ウエスタンブロット分析

により、形質転換植物内で合成された外被蛋白質の検出を行なった (第8図、BR 1ゲル)。その結果、RNA 2+3接種区でRNA 1+2+3接種区と同程度の外被蛋白質が検出された。RNA 1を接種せずにRNA 2+3のみを接種した場合にも、RNA 1+2+3を接種した場合と同程度の外被蛋白質がプロトプラスト内で合成されたことから、BR 1植物ではすべての細胞で完全な1a蛋白質が発現されていると考えられた。

BR 2植物から調製したプロトプラストにインビトロで合成したRNA 1+3を接種した場合にも、外被蛋白質 (2a蛋白質) が検出された (第9図、BR 2ゲル)。RNA 2を接種せずにRNA 1+3のみを接種した場合にも、RNA 1+2+3を接種した場合と同程度の外被蛋白質がプロトプラスト内で合成されたことから、BR 2植物ではすべての細胞で完全な2a蛋白質が発現されていると考えられた。

#### C-5 BMR 1および2植物細胞における導入した遺伝子産物の分析

BMR 1及び2タバコから調製したプロトプラストにインビトロで合成したRNAを接種した。接種48時間後にプロトプラスト内に充満した外蛋白質をウエスタンブロット分析で検出した。その結果、3'末端の非翻訳領域にのみ欠失をもつpB1CBMRベクターを用いてRNA 1のcDNAを導入したBMR 1から調製したプロトプラストにRNA 2+3を接種した場合にも、RNA 1+2+3を接種した場合と同程度の外被蛋白質が検出され、また、BMR 2にRNA 1+3を接種した場合にも外被蛋白質が検出された (第10図、BMRゲル)。BMR 1もしくはBMR 2では、植物ゲノム中に導入されたRNA 1もしくはRNA 2のcDNAの転写物は複製能力を持たないため、ウィルスの複製に必要な1a蛋白質もしくは2a蛋白質の全てを植物ゲノムからの転写および翻訳に依存されることができたことを示している。また、分節ゲノムウィルスの各遺伝子をウィルスの複製を制御機構から設立させ、植物の転写、翻訳機構に依存することができたこ

とが明らかになった。

#### 実施例 3. 形質転換タバコプロトプラストにおける外来遺伝子産物の生産

##### A. 組換えRNA 3転写ベクターpBTGUS 構築 (第4図)

BMV RNA 3の転写ベクターpBTF3をStuIで切断後、平滑末端にSacIリンカーを付加しStuI部位をSacI部位に改変後、SacI切断及びセルフライゲーションを行ない、pBTF3のSacI/StuI断片 (塩1478-1782) を欠失したpBTF3 (Sac) を構築した。

次に、pBTF3 (Sac) の外被蛋白質遺伝子のATG翻訳開始点から6塩基対で断片するHincII部位とSacI部位の間を外来遺伝子と組換えた転写ベクターを構築することを試みた。

BMVを用いた物質生産のリポーター遺伝子として、GUS遺伝子を用いた。pBI101 (東洋紡 (株) K1050) のプロモーターを取り除いたGUS遺伝子をもつHindIII/EcoRI

断片、すなわちGUS遺伝子、ポリリンカー配列およびノバリン合成酵素(NOS)ターミネーターを含む断片を、pUC18のHindⅢ/EcoRI部位に導入しpUCBI101を構築した。pUCBI101から7種類の5'末端を持つGUS遺伝子断片を切り出すことを試みた。ポリリンカー配列中に切断部位をもつHindⅢ、SphⅠ、PstⅠ、BamHI、XbaⅠ、SmaⅠのそれぞれの制限酵素で切断しT4DNAポリメラーゼ処理を行い平滑末端化した後SacⅠで切断し、GUS遺伝子を含むHindⅢ/SacⅠ、SphⅠ/SacⅠ、PstⅠ/SacⅠ、BamHI/SacⅠ、XbaⅠ/SacⅠ、SmaⅠ/SacⅠのそれぞれの断片をpBTF3(Sac)のHicⅡ/SacⅠ部位に導入し、pBTGUS(Hd)、(Sh)、(Pt)、(Sl)、(Xa)、(Bm)および(Sa)のそれぞれの組換えRNA3転写ベクターを構築した(第4図)。これらの組換えRNA3転写ベクターを用いて実施例、

トプラストに180μlの溶解緩衝液(50mMリン酸緩衝液、pH7.0、10mM EDTA、0.1% Triton-X100、0.1% Sarkosyl、10mM β-メルカプトエタノール)を加え懸濁液、10秒間の超音波処理を数回行ないプロトプラストを破壊した。得られた懸濁液を15.000Xg、10分間遠心分離し、約180μlのGUS蛋白質の粗抽出液を得た。このうち45μlにGUSの基質として11μlの10mM MUG(4-メチルウンベリフェニルグルクロニド)を加え、37℃、2時間反応を行なった後、28μlの1M Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>を加え反応を停止した。反応液に365nmのUVを照射し、反応産物である4-MV(4-メチルウンベリフェロン)の発する蛍光を検出した。

その結果、GUS遺伝子を持つ組換えRNA3にRNA1を加えて接種した全ての区でGUS遺伝子の発現が確認され、その発現量はtGUS(Sh)、(Sa)、(Pt)、(Hd)、(Xa)、(Sl)、(Bm)の順であった(第

B-1と同様の方法によりインビトロ的に組換えRNA3を合成し、それぞれをtGUS(Hd)、tGUS(Sh)、tGUS(Pt)、tGUS(Sl)、tGUS(Xa)、tGUS(Bm)およびtGUS(Sa)とした。

#### B. BR2植物におけるGUS遺伝子の発現

##### B-1 GUS活性の分析

BR2植物から調製したプロトプラストにインビトロ的に合成したRNA1およびGUS遺伝子を持つ組換えRNA3 tGUS(Hd)、tGUS(Sh)、tGUS(Pt)、tGUS(Sl)、tGUS(Xa)、tGUS(Bm)およびtGUS(Sa)のいずれかをそれぞれ接種した。ネガティブコントロールとしてtGUS(Hd)、tGUS(Sh)、tGUS(Pt)、tGUS(Sl)、tGUS(Xa)、tGUS(Bm)およびtGUS(Sa)のみをそれぞれ接種した。

接種後48時間培養したプロトプラストを100Xg、2分間の遠心分離によって集めた。プロ

トプラストに180μlの溶解緩衝液(50mMリン酸緩衝液、pH7.0、10mM EDTA、0.1% Triton-X100、0.1% Sarkosyl、10mM β-メルカプトエタノール)を加え懸濁液、10秒間の超音波処理を数回行ないプロトプラストを破壊した。得られた懸濁液を15.000Xg、10分間遠心分離し、約180μlのGUS蛋白質の粗抽出液を得た。このうち45μlにGUSの基質として11μlの10mM MUG(4-メチルウンベリフェニルグルクロニド)を加え、37℃、2時間反応を行なった後、28μlの1M Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>を加え反応を停止した。反応液に365nmのUVを照射し、反応産物である4-MV(4-メチルウンベリフェロン)の発する蛍光を検出した。

第1表 AB培地

溶液1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4g
溶液2	NH <sub>4</sub> Cl	4g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.2g
	KCl	0.6g
	CaCl <sub>2</sub>	0.6g
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10mg
溶液3	Glucose	20g

・それぞれ蒸留水に溶解し、200mlにする。溶液1、2、3をそれぞれ5mlとり、85mlの蒸留水と1.5gのBacto-agarを加えオートクレイブ殺菌する。カナマイシン添加する場合は45℃に冷した後、50μg/mlになるように加える。ペトリ皿(直径9cm)3枚に分注する。

第2表 L S 培 地

LS	培地ストック液の作製法 (200ml当たり)
Stock 1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ 33g $\text{KNO}_3$ 38g
Stock 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.4g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 3.4g
Stock 3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.8g
Stock 4	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0.746g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.666g
Stock 5	$\text{H}_2\text{BO}_3$ 0.124g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.172g $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.446g $\text{KI}$ 0.017g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005g
Stock 5'	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05g
Stock 6	Thiamine- $\text{HCl}$ 0.008g Myo-Inositol 2.0g
Stock 7	Naphthalene acetic acid (NAA) 0.042g
Stock 8	6-Benzyladenina (BAP) 0.004g
Stock 9	6-Benzyladenina (BAP) 0.1g
Stock 10	Myo-Inositol 2g Glycine 0.04g Pridoxin- $\text{HCl}$ 0.01g Nicotinic acid 0.01g Thiamine- $\text{HCl}$ 0.02g

・BAPはまず0.1N $\text{HCl}$  30mlに溶解(濃縮)し、その残水を加えて200mlとする。

LS 培地の作製法 (1l)

- ① 2mlのStock 5'を200mlの新しいStock 5に加え、以後これを使用する。
- ② Stock 1、2、3、4、5、6を各10mlずつ入れる。
- ③ 下表に従ってホルモンStockを加える。
- ④ sucrose 30gを加え、イオン交換水で1lとする。
- ⑤  $\text{NaOH}$ あるいは $\text{KOH}$ で $\text{pH}$ を5.8~6.2に調整する。
- ⑥ 0.8~1%の寒天を加え、培養用ポットでオートクレイブする。
- ⑦ 50~60℃にした後、ポットを軽く振り混ぜ、室温に放置し、固化させる。抗生物質を添加する場合は50~60℃にした後、フィルター滅菌した抗生物質を添加する。

	ホルモン濃度 (タバコの場合)		
	Stock 7	Stock 8	Stock 9
カルス用 (LS1)	10ml	10ml	—
発芽用 (LS4)	0.5ml	—	10ml
発根用 (LS7)	2.5ml	5ml	—
幼穂物用 (LS8)	—	—	—

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、BMVの遺伝子発現様式である。

第2図は、BMV各遺伝子のタバコ形質転換用ベクターである。

第3図は、転写ベクターへのBMV RNA完全長cDNAの導入とT7 RNAポリメラーゼを用いたインビトロBMV RNA合成を示す。

第4図は、組換えRNA3の転写ベクターの構築を示す。

第5図は、CaMV35Sプロモーターへの制限酵素部位の導入法を示す。

第6図は、BMX RNA完全長cDNAを導入した形質転換ベクターpBLC BR1~3の構築を示す。

第7図は、3'末端非翻訳領域に欠失を持つBMV RNAのcDNAを導入した形質転換ベクターpBLC BMR1、2及び3の構築を示す。

第8図は、BR1タバコ細胞内で蓄積したBMV外被蛋白質のウエスタンブロット分析結果を示す写真(電気泳動)。

第9図は、BR2タバコ細胞内で蓄積したBMV外被蛋白質のウエスタンブロット分析の結果を示す写真(電気泳動)。

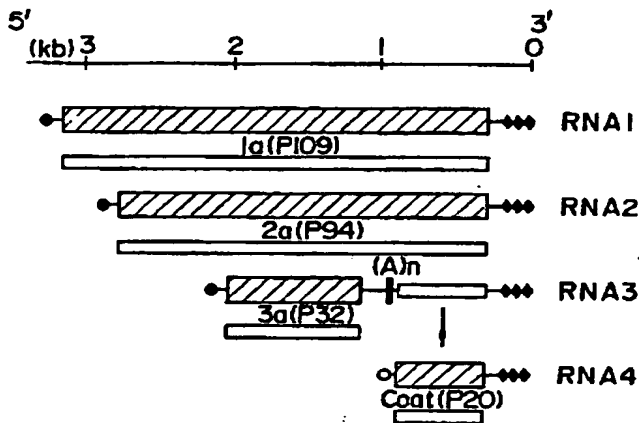
第10図は、BMR1及びBMR2タバコ細胞内で蓄積したBMV外被蛋白質のウエスタンブロットの分析を示す写真(電気泳動)。

第11図は、BR2タバコにおけるGUS遺伝子の発現について蛍光法の結果を示す写真。

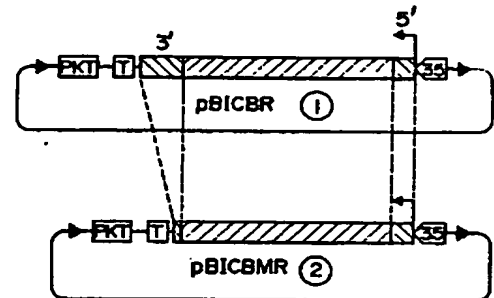
第12図は、所望のポリペプチドの発現法を示す模式図である。

代理人 横 村 祐





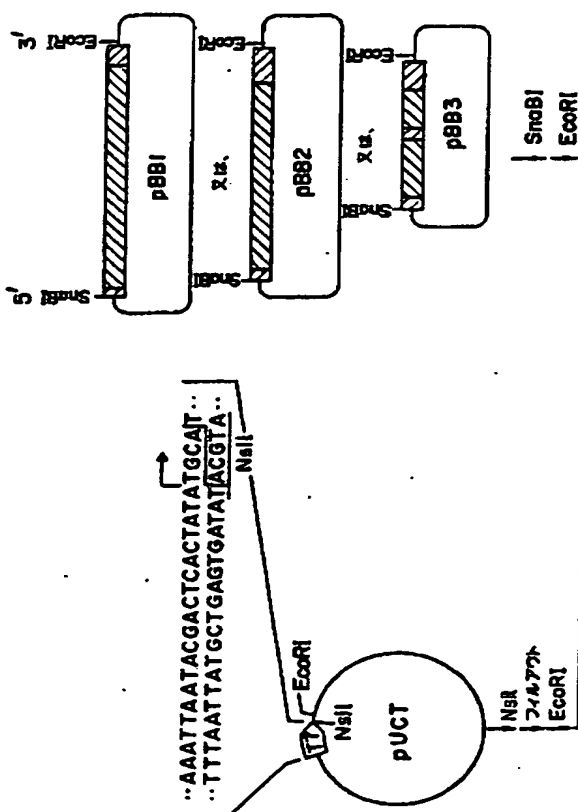
第1図 BMVの遺伝子発現様式



第2図 BMV各遺伝子のクローニングベクター

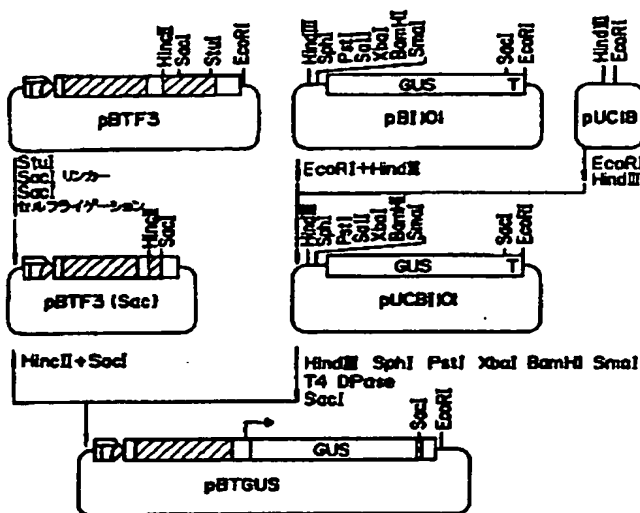
PKT: MOSプロモーター-カナマイシン耐性遺伝子、およびMOSターミネーター  
35: CoMV 35S RNAプロモーター  
T: CoMVターミネーター  
▶: T1プラスミドのT-DNA境界配列  
▨: BMV RNAの非翻訳領域に対するcDNA  
▩: BMV RNAの翻訳領域に対するcDNA  
↑: 転写開始点と転写方向

①型: BMV RNAの完全長cDNAを挿入した転写ベクター  
②型: 3'端の非翻訳領域にのみ欠失をもつBMV RNAのcDNAを挿入した転写ベクター



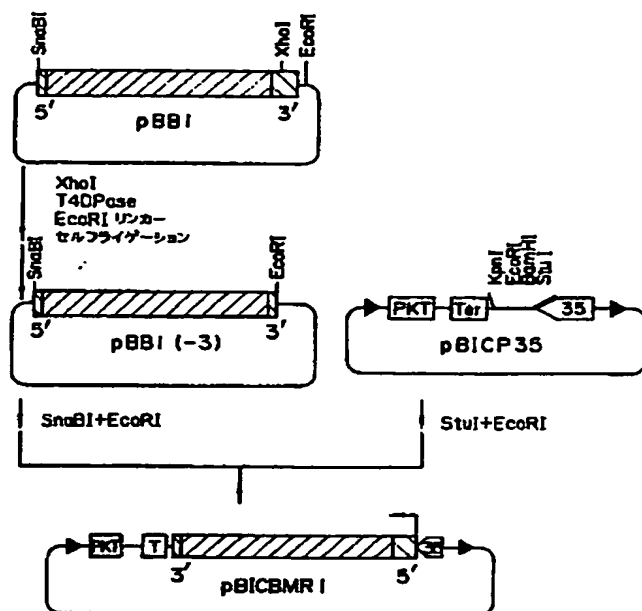
第3図 BMV RNAの完全長cDNAの転写ベクター(pUCT)への導入とT7 RNAポリメラーゼを用いたインビトロBMV RNA合成

T7: T7 RNAポリメラーゼ  
p: 転写開始点および転写方向  
m<sup>7</sup>GpppG: キヤプチャー  
↑: キヤプチャー  
~: BMV RNAの3'に付加される部分を意味



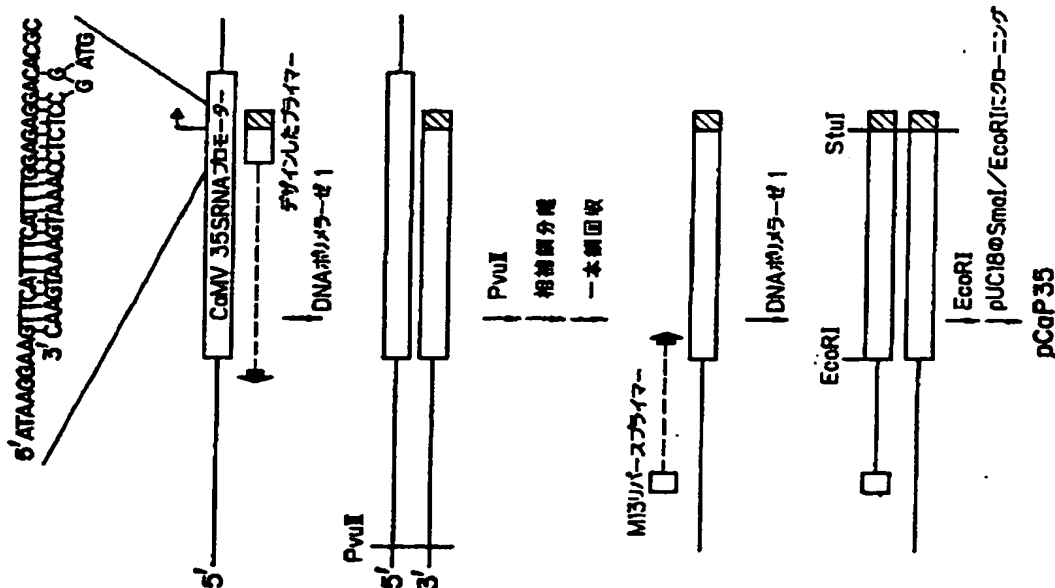
第4図 BMV外被蛋白質遺伝子をGUS(β-グルクロニダーゼ)遺伝子と置換した感染RNA3の転写ベクターの構築

- : BMV RNAの非翻訳領域に対するcDNA
- ▨: BMV RNAの翻訳領域に対するcDNA
- T: T7プロモーター
- : BMV RNA4の合成開始点と転写方向



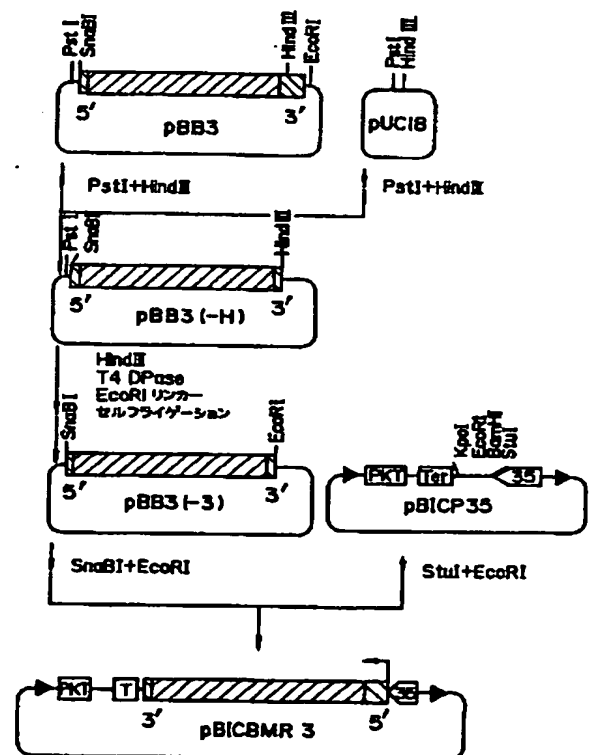
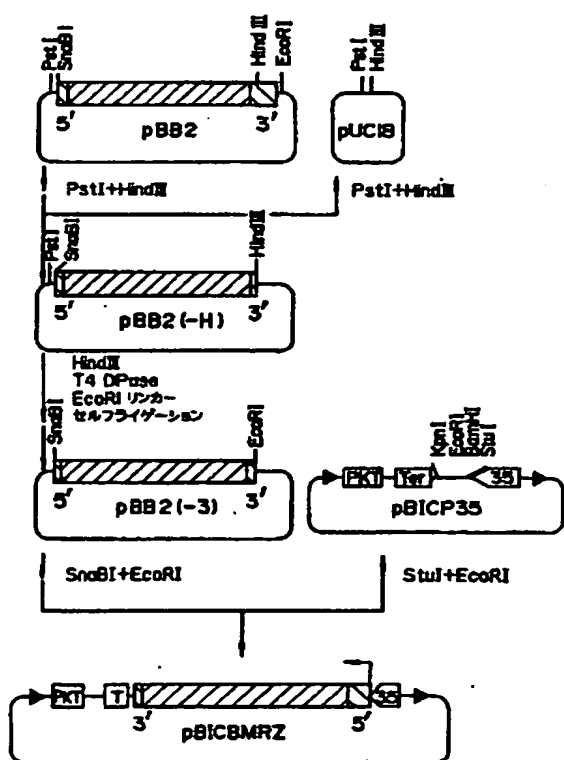
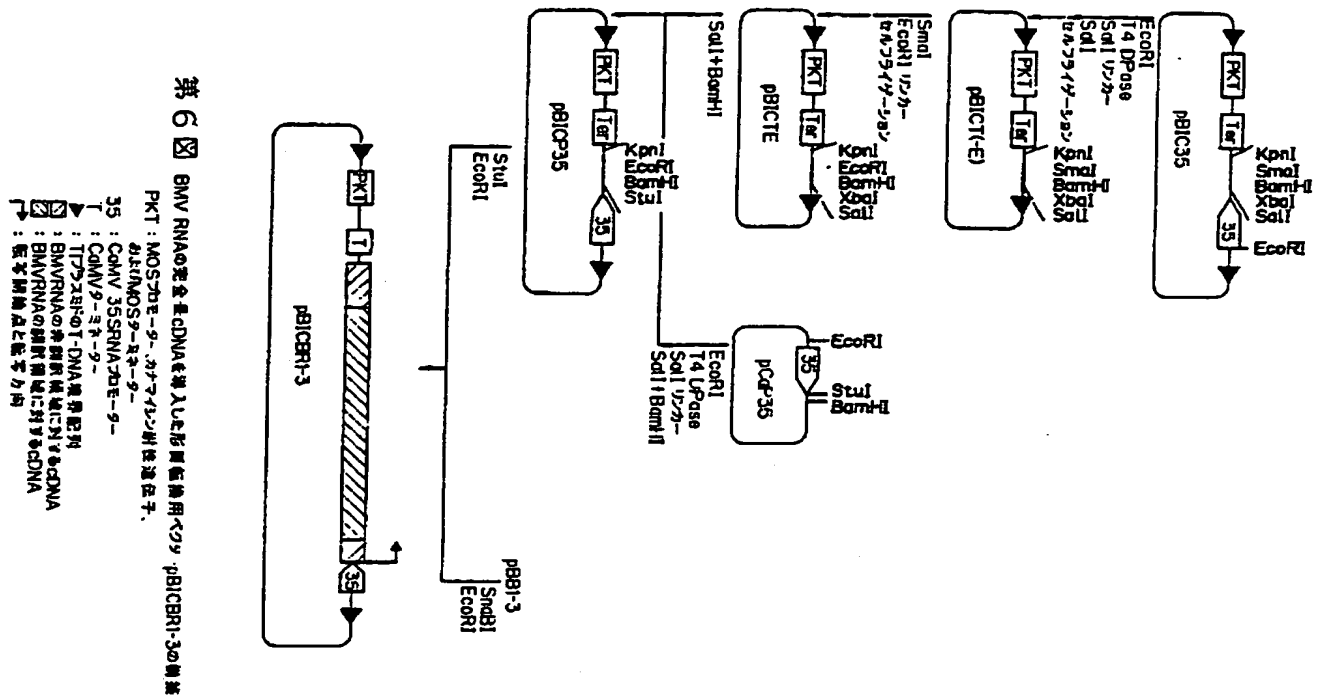
第7図 その1

- PKT: MOSプロモーター、カナマイシン耐性遺伝子およびMOSターミネーター
- 35: CoMV 35SRNAプロモーター
- T: CoMVターミネーター
- : T7プラスミドのT-DNA境界配列
- : BMV RNAの非翻訳領域に対するcDNA
- ▨: BMV RNAの翻訳領域に対するcDNA
- : 転写開始点と転写方向

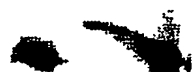


第5図

- 部位特異的突然変異導入法によるCoMV 35SRNAプロモーターの転写開始点への制限酵素部位(SmaI)の導入
- ▨: 突然変異導入塩基配列
- : 転写開始点と転写方向



1 2 3 4 5

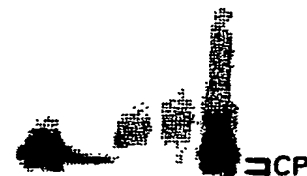


第9図

インビトロ転写産物を接種したBR2タバコ細胞内で  
蓄積したBMV外皮蛋白質のウェスタンブロット分析

レーン1-5 : BR2タバコ  
レーン1 : RNA1+2+3接種  
レーン2 : 空白  
レーン3 : mock接種  
レーン4 : RNA2+3接種  
レーン5 : RNA1+3接種

1 2 3 4 5



第8図

インビトロ転写産物を接種したBR1タバコ細胞内で蓄積した  
BMV外皮蛋白質のウェスタンブロット分析

レーン1 : RNA1+2+3接種  
レーン2 : 空白  
レーン3 : Mock接種  
レーン4 : RNA1+3  
レーン5 : RNA2+3

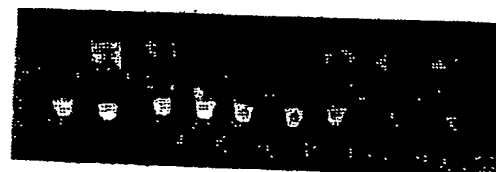
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



第10図

インビトロ転写産物を接種したBMR2およびBR2タバコ細胞内で  
蓄積したBMV外皮蛋白質のウェスタンブロット分析

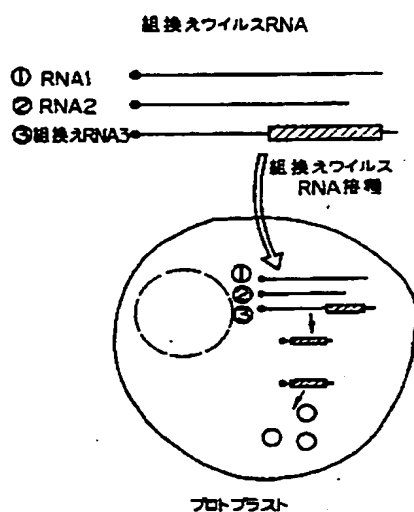
レーン1-5 : BMR2タバコ レーン6-10 : BR2タバコ  
レーン5,10 : RNA1+2+3接種  
レーン4,9 : 空白  
レーン3,8 : mock接種  
レーン2,6 : RNA2+3接種  
レーン1,7 : RNA1+3接種



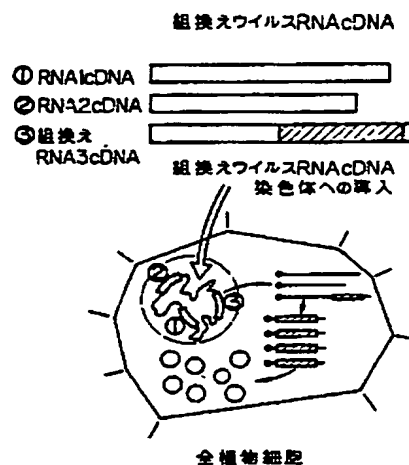
第11図

形質転換タバコ(BR2タバコ)におけるGUS遺伝子の発現

1 : RNA1+IGUS(Sh)接種  
2 : RNA1+IGUS(Sm)接種  
3 : RNA1+IGUS(Xd)接種  
4 : RNA1+IGUS(Pt)接種  
5 : RNA1+IGUS(Xg)接種  
6 : RNA1+IGUS(Si)接種  
7 : RNA1+IGUS(Sh)接種  
8 : IGUS(Sh)接種  
9 : mock接種



第12図 その1



第12図 その2

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5

A 01 H 5/00  
C 12 N 5/14  
15/40  
// (C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

A 8502-2B

## 手 続 補 正 書

平成 3 年 10 月 18 日

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

平成2年特許願第238234号

## 2. 発明の名称

植物細胞におけるポリペプチドの製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 日本農薬株式会社

## 4. 代 理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新 大 手 町 ビ ル ダ ン グ 331

電 話 (3211) 3 6 5 1 (代 表)

氏 名 (6669) 浅 村 皓

## 5. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄  
発明の詳細な説明の欄  
図 面

## 6. 補正の内容 別紙のとおり

あるのを「される。Tiプラスミド」と訂正する。

(9) 同第16頁第14行「ホスホトリシン」とあるのを「ホスホノトリシン」と訂正する。

(10) 同第17頁第12行「導入して」とあるのを「導入した」と訂正する。

(11) 同第19頁第4行「Viol」とあるのを「Biol」と訂正する。

(12) 同第23頁第15行「できる。〔発明の効果〕」とあるのを以下の通りに訂正する。  
「できる。

〔発明の効果〕」

(13) 同第23頁第17行「複製酵素」とあるのを「複製酵素遺伝子」と訂正する。

(14) 同第24頁第13行「ササゲトリブシンインヒビター」とあるのを「ササゲトリブシンインヒビター」と訂正する。

(15) 同第25頁第10行「ATCCBB系統」とあるのを「ATCC 66系統」と訂正する。

1. 特許請求の範囲を別紙の通り補正します。

2. 明細 中の発明の詳細な説明の項を以下の通り補正します。

(1) 明細書第2頁第20行「bromemosaic」とあるのを「brome mosaic」と訂正する。

(2) 同第9頁第9行「3'末端非翻訳領域に」とあるのを「BMV RNAの3'末端非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分に」と訂正する。

(3) 同第9頁第19行「又は3の」とあるのを「又は組換えBMV RNA3」と訂正する。

(4) 同第10頁第1行～第2行「3'末端非翻訳領域」とあるのを「BMV RNA3'末端非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分」と訂正する。

(5) 同第11頁第1行「BMV RNA、」とあるのを「BMV RNAは、」と訂正する。

(6) 同第13頁第18行「ターミネータ」とあるのを「ターミネーター」と訂正する。

(7) 同第14頁第16行「BMVRNA」とあるのを「BMV RNA」と訂正する。

(8) 同第15頁第4行「されるTiプラスミド」と

(16) 同第26頁第17行「ポリメラーゼ不可欠」とあるのを「ポリメラーゼが不可欠」と訂正する。

(17) 同第27頁第4行「(1963)」とあるのを「(1983)」と訂正する。

(18) 同第27頁第4行「Viol」とあるのを「Biol」と訂正する。

(19) 同第27頁第12行「Yirology」とあるのを「Virology」と訂正する。

(20) 同第28頁第11行及び同第19行「ナカライデスク」とあるのを「ナカライテスク」と訂正する。

(21) 同第31頁第5行「BMVRNA」とあるのを「BMV RNA」と訂正する。

(22) 同第33頁第2行「ZX」とあるのを「2X」と訂正する。

(23) 同第33頁第15行「358」とあるのを「359」と訂正する。

(24) 同第37頁第12行「テルモ」とあるのを「テルモ社製」と訂正する。

- (25) 同第38頁第14行「358」とあるのを「35S」と訂正する。
- (26) 同第46頁第18行「グース」とあるのを「グロース」と訂正する。
- (27) 同第50頁第9行「0.71培」とあるのを「0.7i培」と訂正する。
- (28) 同第51頁第17行「焼成」とあるのを「調製」と訂正する。
- (29) 同第60頁第12行「BMX」とあるのを「BMV」と訂正する。
- (30) 同第15行「3'末端の非翻訳領域」とあるのを「BMV RNA3'末端の非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分」と訂正する。
- (31) 同第17行「pBLC BMR」とあるのを「pBICBMR」と訂正する。

- (4) 第7図その1
- (5) 第7図その2
- (6) 第11図

3. 下記図面の付記部分を別紙の通り補正致します。

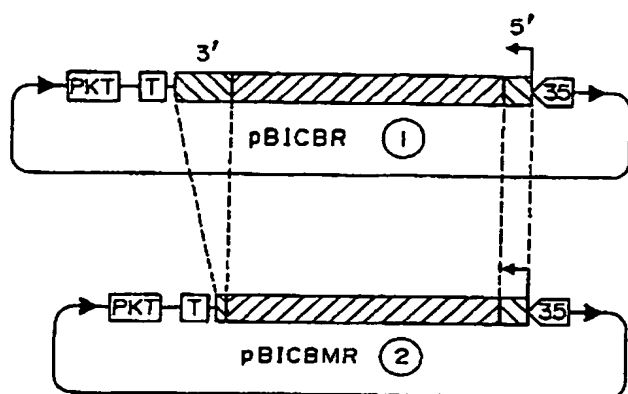
- (1) 第2図
- (2) 第4図
- (3) 第6図

## 「2. 特許請求の範囲

- (1) 植物ゲノムにBMVのRNA1及び/又は2のcDNA及びBMV RNA外被蛋白質遺伝子の全部又は一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換えた組換えBMV RNA3のcDNAを導入又は接種することによって、所望のポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチドの製造法。
- (2) 植物ゲノムにBMVのRNA1及び/又は2のcDNAを導入することによって、1a及び又は2a蛋白質を生産し、該植物細胞に組換えBMV RNA3を接種することによって、ポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチドの製造法。
- (3) 上記cDNAが、完全長cDNA若しくはBMV RNAの3'末端非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分に欠失をもつcDNAである請求項1又は2記載の製造法。
- (4) インビトロ的に機能的なプロモーターとBMVのRNA3 cDNAからなるベクターであって、BMV RNA3外被蛋白質遺伝子の全部または一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換え

た組換えBMV RNA3を生産する転写ベクター。

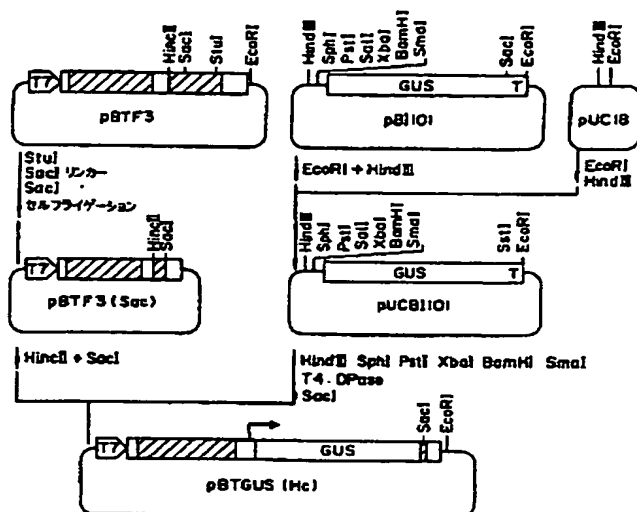
- (5) 請求項1又は2記載の製造法に使用するための、植物細胞中で機能的なプロモーター及びターミネーター間に、BMV RNA1、2又は組換えBMV RNA3のcDNAを導入した植物形質転換用ベクター。
- (6) 上記cDNAが完全長cDNA若しくはBMV RNA3'末端非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分に欠失をもつcDNAである請求項5のベクター。
- (7) 請求項5又は6記載のベクターで形質転換された植物細胞。」



第2図 BMW各道伝子のタロ形質転換用ベクター

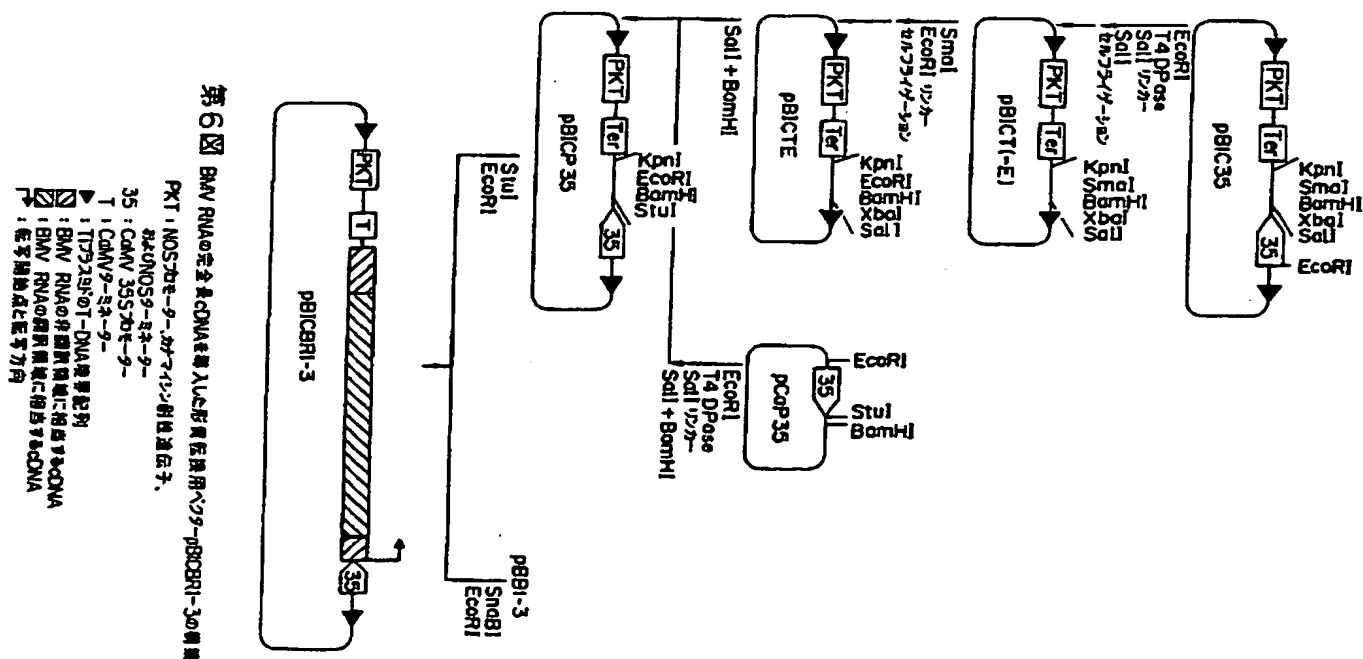
PKT: NOSプロモーター、カナマイシン耐性遺伝子、  
およびNOSターミネーター  
35: CaMV 35Sプロモーター  
T: CaMVターミネーター  
▶: TiプラスミドのT-DNA境界配列  
☒: BMV RNAの非翻訳領域に相当するcDNA  
☒: BMV RNAの翻訳領域に相当するcDNA  
▶: 転写開始点と転写方向

- ②型: BMV RNA 3' 端の非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分にのみ欠失をもつ BMV RNA の cDNA を挿入した形質転換用ベクター

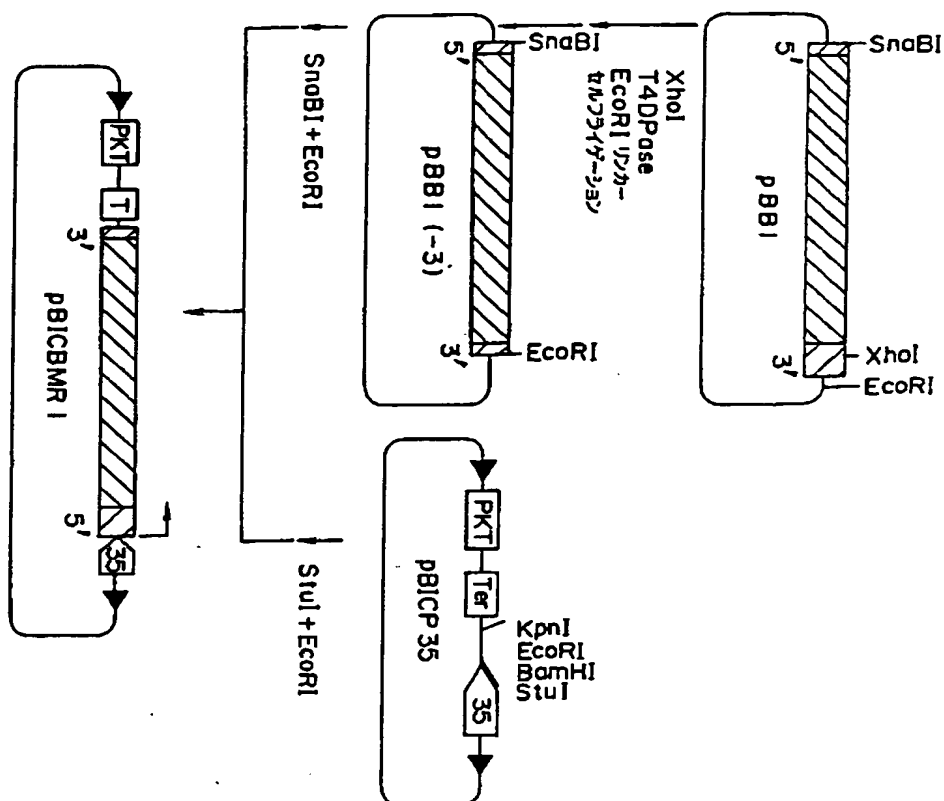


**第4図** BMV外被蛋白質遺伝子をGUS( $\beta$ -グルコニダーゼ)遺伝子と置換した組換えRNA3の転写ベクターの構築

- : BMV RNAの非膜肌領域に相当するcDNA  
 ▨: BMV RNAの膜肌領域に相当するcDNA  
 T7: T7プロモーター  
 ↑: BMV RNA4の合成開始点と合成方向

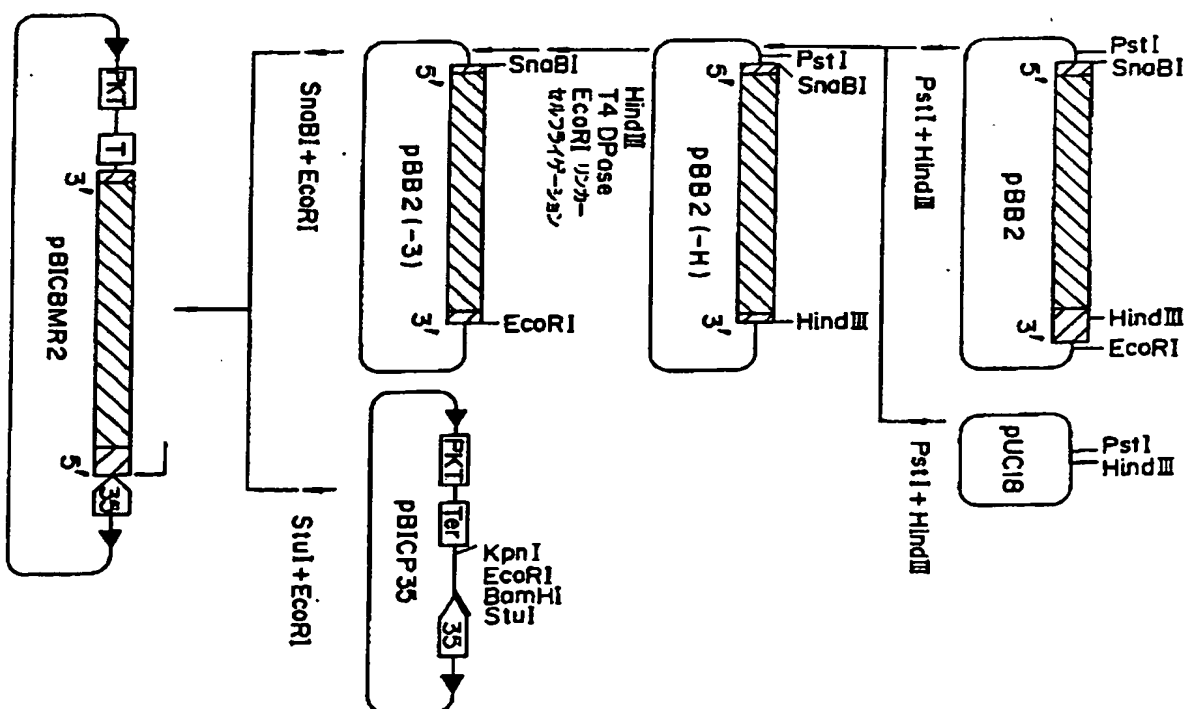






第7図 その1

PKT : NOSカゼ-9-、カサイン耐性遺伝子  
 ぬおNOS9-ミネ-9-  
 35 : CdmV 35Sカゼ-9-  
 T : CdmV9-ミネ-9-  
 ▶ : T7ラジシのT-DNA境界配列  
 □ : BMV RNAの非翻訳領域に相当するcDNA  
 ◀ : BMV RNAの翻訳領域に相当するcDNA  
 ↑ : 転写開始点と転写方向



第7図 その2



第11図 形質転換タニコ(BR2タニコ)におけるGUS遺伝子の発現

- 1: RNAI+tGUS(Sh)接種
- 2: RNAI+tGUS(Sm)接種
- 3: RNAI+tGUS(Hc)接種
- 4: RNAI+tGUS(Pi)接種
- 5: RNAI+tGUS(Xc)
- 6: RNAI+tGUS(SC)接種
- 7: RNAI+tGUS(Sh)接種
- 8: tGUS(Sh)接種
- 9: mock接種

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)12月2日

【公開番号】特開平4-121200

【公開日】平成4年(1992)4月22日

【年通号数】公開特許公報4-1212

【出願番号】特願平2-238234

【国際特許分類第6版】

C12P 21/00

A01H 5/00

C12N 5/10

15/09

//(C12P 21/00

C12R 1:91 )

【F I】

C12P 21/00 C

A01H 5/00 A

C12N 15/00 A

5/00 C

## 手 続 補 正 書

平成9年3月12日

特許庁長官殿

### 1. 事件の表示

平成2年特許願第238234号

### 2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 日本農薬株式会社

### 3. 代 理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新 大 手 町 ビ ル デ ン グ 3 3 1

電 話 (3211)3651(代表)

氏 名 (6669)浅 村 皓

### 4. 補正により増加する請求項の数

2

### 5. 補正の対象

明細 の特許請求の範囲の欄

### 6. 補正の内容

別紙のとおり

### 12. 特許請求の範囲

(1) 植物ゲノムにBMVのRNA1及び/又は2のcDNA及びBMV RNA外被蛋白質遺伝子の全部又は一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換えた組換えBMV RNA3のcDNAを導入又は接種することによって、所望のポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチドの製造法。

(2) 植物ゲノムにBMVのRNA1及び/又は2のcDNAを導入することによって、1a及び/又は2a蛋白質を生産し、該植物細胞に組換えBMV RNA3を接種することによって、ポリペプチドを発現することを特徴とするポリペプチドの製造法。

(3) 上記cDNAが、完全長cDNA若しくはBMV RNAの3'末端非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分に欠失をもつcDNAである請求項1又は2記載の製造法。

(4) 植物細胞で機能するプロモーター、BMV RNA1及び/又は2のcDNA、植物細胞で機能するターミネーターを含有するDNA分子。

(5) 植物細胞で機能するプロモーター、組換えBMV RNA3のcDNA、植物細胞で機能するターミネーターを含有するDNA分子。

(6) インビトロ的に機能するプロモーターとBMVのRNA3 cDNAからなるベクターであって、BMV RNA3外被蛋白質遺伝子の全部または一部を所望のポリペプチドの構造遺伝子と組換えた組換えBMV RNA3を生産する転写ベクター。

(7) 請求項1又は2記載の製造法に使用するための、植物細胞中で機能するプロモーター及びターミネーター間に、BMV RNA1、2又は組換えBMV RNA3のcDNAを導入した植物形質転換ベクター。

(8) 上記cDNAが完全長cDNA若しくはBMV RNA3末端非翻訳領域に相当するヌクレオチド部分に欠失をもつcDNAである請求項7のベクター。

(9) 請求項7又は8記載のベクターで形質転換された植物細胞。